Aus der Abteilung für
Laboratoriumsdiagnostik von Hormon- und Stoffwechselstörungen
Direktor: Professor Dr. D. Gupta
der Kinderklinik der Universität Tübingen

Einfluß von chronischer Androstandiolgabe auf die Gonadotropinausschüttung der männlichen Ratte

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von

HEINRICH HERMRECK

aus Neuenkirchen

1980

Aus der Abteilung für
Laboratoriumsdiagnostik von Hormon- und Stoffwechselstörungen
Direktor: Professor Dr. D. Gupta
der Kinderklinik der Universität Tübingen

Einfluß von chronischer Androstandiolgabe auf die Gonadotropinausschüttung der männlichen Ratte

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von

HEINRICH HERMRECK

aus Neuenkirchen

1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. H.Heimann
Berichterstatter: Professor Dr. D.Gupta

INHALTSVERZEICHNIS

1.	Einleitung	Seite	1
2.	Material und Methode		3
2.1	Versuchsaufbau (allgemein)		3
2.2	Tierhaltung		3
2.3	Materialien		3
2.4	Injektion		6
2.5	Serumgewinnung		6
2.6	Hypophysengewinnung und Verarbeitung		6
2.7	Radioimmunoassay		7
2.7.1	Theorie (allgemein)		7
2.7.2	Beschreibung (speziell)		8
2.7.3	Jodierung		9
2.7.4	Säulenherstellung		1o
2.7.5	Standardkurven		12
2.7.6	Jodierungsberechnungen		17
2.7.7	Testungen		18
2.7.7.1	Geometrietest		18
2.7.7.2	Testung der B_o-Bindung		18
2.7.7.3	Bindungstest für 1. und 2. Antikörper		19
2.7.7.4	Test auf Verlässlichkeit des Radioimmunoassay		2o
2.7.8	Inter-und Intraassayvariation		21
3.	Ergebnisse		22
3.1	Serum LH der Kontroll- und Versuchstiere		22
3.2	Serum FSH der Kontroll- und Versuchstiere		23

3.3	Hypophysen LH der Kontroll- und Versuchstiere	24
3.4	Hypophysen FSH der Kontroll- und Versuchstiere	25
4.	Diskussion	26
5.	Zusammenfassung	3o
6.	Literatur	31
7.	Anhang	

1. EINLEITUNG

Die Versuche, welche an eine Steuerung der Pubertät durch Hypothalamus, Hypophyse und Gonaden denken ließen liegen schon weit zurück (DONOVAN, 1959; HARRIS, 1952; ZONDEK, 1926; HOHLWEG, 1932). Inzwischen wurde eine Fülle neuer Ergebnisse, vorwiegend am Standardversuchstier der Albinoratte, gewonnen und zusammengetragen. Insbesondere die Entdeckung des Dekapeptides LH-RH durch SCHALLY, 1971 und dessen Synthese gaben der Forschung im Bereich des Hypothalamus und der Hypophyse neuen Auftrieb.
Eine der fundamentalen Tatsachen bezüglich des Zusammenspiels von Gonaden und Hypophyse bzw. Hypothalamus ist die nagative Rückkopplung zwischen gonadalen Steroiden und Gonadotropinen (GUPTA, 1974). Diese Rückkopplung ist Ausgang für die sogenannte Hypothalamische-hypophysäre-gonadale Achse, ein Modell mittels welchem die unterschiedlichen hormonellen Zustände in den verschiedenen Reifungsstadien erklärt werden. Die Übergänge vom unreifen zum reifen Zustand erklärt die Hypothese der "Differential Feedback Sensitivity" (siehe GUPTA, 1977; sowie EICHNER, 1975). Die Gründe dieser Differential-Feedback-Sensitivität werden noch nicht verstanden. Eine wichtige Rolle kommt vermutlich den gonadalen Steroiden zu, es konnte nämlich durch KINGSLEY, 1973 gezeigt werden, daß die Funktion des Hypophysenvorderlappens durch direkte Wirkung von Androgenen verändert werden kann. Da nun der Hypophysenvorderlappen die Fähigkeit besitzt Testosteron zu den 5 α - reduzierten Substanzen DHT und Androstandiol umzusetzen (STERN, 1971;

MASSA et al. 1972 , DENEF et al. 1974 , KLEMM et al. 1976) interessiert in dieser Arbeit speziell der Einfluss des 5-alpha-Androstandiols auf die Gonadotropinkonzentrationen im Serum und in der Hypophyse, insbesondere, da die spezielle Rolle des Androstandiols auf die Feedbackwirkung zu den verschiedenen Entwicklungsstadien nach chronischer Gabe noch nicht genauer untersucht wurde.

Zu diesem Zweck sollten männliche Ratten an jedem Lebenstag 4 Mikrogramm Androstandiol pro 1oo Gramm Körpergewicht verabreicht werden und von den so behandelten Tieren zu allen Entwicklungsstufen vom 1. bis zum 76. Lebenstag (Erwachsenenalter) zu repräsentativen Zeitpunkten Blut gewonnen werden.

Es sollten dann LH sowie FSH im Serum und in der Hypophyse bestimmt werden, zueinander in Beziehung gebracht und mit Kontrolltieren verglichen werden.

Aus diesem experimentellen Ansatz sollten Informationen zu erhalten sein über den direkten Einfluss des 5-alpha-Androstandiols auf den Hypophysenvorderlappen und damit die Frage nach der Rückkopplungsfähigkeit dieses Organs auf das spezielle Steroid sowie den Androgeneinfluss im besonderen beantwortet werden.

2. MATERIAL UND METHODE

2.1. Versuchsaufbau (allgemein)

Männliche Wistar-Ratten (Fa. Ivanovas, Kißlegg/ Allgäu) erhielten vom 1. Lebenstag an täglich in der Zeit von 12-13,45 0,04 µg/g Körpergewicht Androstandiol (5α-Androstan 3α, 17β-diol) in einer 33,3% äthanolischen Lösung subkutan. Die Kontrolltiere erhielten nur diese äthanolische Lösung in gleichem Volumen. Im Alter von 0,2,5,1o,16,2o,25,28,3o,33,35,4o,5o,56,65,76 Tagen wurden die Tiere geopfert und die Gonadotropine in Serum und Hypophyse bestimmt.

2.2. TIERHALTUNG

Je Muttertier wurden 1o männliche Jungtiere in einen Käfig gegeben. Die Tiere befanden sich im Tierstall der Kinderklinik bei 20°C Raumtemperatur, künstliche Beleuchtung zwischen 6 Uhr und 19 Uhr und hatten Wasser und Rattentrockenfutter ad libitum. Im Verlauf des Experimentes (Tag 3o) reduzierte sich die Anzahl der Tiere pro Käfig auf 5, nach dem am 22. Lebenstag das Muttertier aus dem Käfig herausgenommen wurde.

2.3. MATERIALIEN

CHEMIKALIEN:

Fa. MERCK, Darmstadt

Dinatriumhydrogenphosphat x $2H_2O$	Nr. 6580
Natriumdihydrogenphosphat x 2 H_2O	Nr. 6345
Natriumchlorid	Nr. 6404
Kaliumjodid neutral	Nr. 5o43
Äthylendinitrilotetraessigsäure	Nr. 8436
Chloramin T (Trihydrat)	Nr. 2426

Natriumpyrosulfit Nr. 6528
Chloroform Nr. 2445
Bromphenoblau Nr. 8122
Äther Nr. 921
Äthanol absolut Nr. 972

Fa. SERVA - Feinbiochemika Heidelberg
Saccharose reinst Nr.35580
Äthylmercurithiosalicylsäure Nr.11375

Fa. BEHRINGWERKE, Marburg/Lahn
Rinderserumalbumin

Fa. RADIOCHEMICAL CENTRE, Amersham, England
125 - (Na-Salz) IMS 30

Fa. WELLCOME Reagents Ltd., Beckenham, England
Rabbit Serum inactivated
Precipitatung Serum for Radioimmunoassay
(Anti-Rabbit-Gamma-Globulin)

NATIONAL INSTITUTE OF ARTHRITIS AND METABOLIC DESEASES AND DISORDERS (NIAMDD) BETHESDA, MD. USA
Purified Rat Luteinizing Hormone
(NIAMDD-Rat LH-I-3)
Antiserum to Rat Luteinizing Hormone
(NIAMDD-Anti-Rat-LH Serum-1)
Reference Preparation (NIAMDD-Rat LH-RP-1)
Purified Rat Follicle Stimulating Hormone
(NIAMDD-Rat -SH-I-1)
Antiserum to Rat Follicle Stimulating Hormone
(NIAMDD-Anti-Rat FSH-Serum -6)
Reference Preparation (NIAMDD-Rat FSH-RP-1)

Puffer: Elutionspuffer, pH 7.6
13,2 ml 0,1 M $NaH_2PO_4 \times 2H_2O$
+ 86,8 ml 0,1 M $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$
+ 8,7 g NaCl = 0,15 M
+ 100 mg Merthiolat = 0,01%
ad 1 l H_2O destillata = 0,01 M Phosphatpuffer

Diluent ,pH 7.6
Elutionspuffer
+ 1% Rinderserumalbumin

Stammpuffer ,pH 7.6
3,45 g $NaH_2PO_4 \times 2H_2O$
+ 0,8737 g $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$
ph Angleichung mit 1N NaOH
ad 500 ml H_2O destillata

Assaypuffer ,ph 7.6
Elutionspuffer
+ 18,6 g EDTA
+ 30 ml Rabbitserum
ad 1 l H_2O destillata

Transferlösung
1% Kaliumjodid
+ 16% Sucrose in P_1
+ Spur Bromphenolblau

2% BSA-Lösung
2 g Rinderalbumin in Elutionspuffer

2.4 INJEKTION

Vor jeder Injektion wurden die Tiere gewogen. Die Injektion erfolgte in der Zeit von 12-13,45. Dazu wurde Androstandiol in reinem Athanol gelöst und mit Salinelösung auf 33,3% verdünnt. Die täglich verabreichte Dosis betrug 0,04 ug/g Körpergewicht. Anfänglich war das Injektionsvolumen 2o µl ab Tag 35 betrug dieses dann 50 µl. Es wurde dorsal subkutan injiziert. Die Kontrolltiere erhielten das Lösungsmittel zu gleichen Volumina.

2.5 SERUMGEWINNUNG

In Übereinstimmung mit früheren Experimenten im Labor von Prof. GUPTA wurde an den im Versuchsaufbau beschriebenen Tagen das Blut der Versuchstiere mittels Dekapitation mit einer Schere gewonnen. Das aus dem Rumpf tropfende Blut wurde mit einem Glastrichter in einem Reagenzröhrchen aufgefangen und nach ca. 1 1/2 Stunden Gerinnungszeit bei Zimmertemperatur zentrifugiert. (10 min. in der Tischzentrifuge Typ UJ 2 der Fa. CHRIST bei 3000 U/min.). Das Serum wurde in der für die Bestimmung benötigten Menge in den Assayröhrchen (10 x 65 mm, Fa. SARSTEDT) bei - 20°C aufbewart.

2.6 HYPOPHYSENGEWINNUNG UND - VERARBEITUNG

Unmittelbar nach Dekapitation wurde die Schädeldecke eröffnet und das Groß- und Kleinhirn von vorne her abgetragen. Nach Öffnung der Dura wurde die Hypophyse aus der Sella turcica mit einer Pinzette herausgenommen, eventuelle Blutstropfen abgetupft, und sofort in einem abgewogenen Schnapp-

glas mit Trockeneis eingefroren. Der Vorgang der Hypophysengewinnung dauerte maximal 2-3 Minuten. Die Schnappdeckelgläser wurden bis zur Verarbeitung bei - 20°C gelagert. Zur Verarbeitung wurden die Gefäße aufgetaut und auf 0,1 mg genau gewogen. Danach wurden die Hypophysen entnommen und mittels eines Homogenisators (Typ RM 14, Fa. JANKE + KÜNKEL KG, Staufen im Breisgau) zwei Minuten lang in 1 ml Elutionspuffer ph 7.6 homogenisiert. Das Gefäß wurde nach der Homogenisation mit einem weiteren Milliliter des Elutionspuffers gespült und dieser mit dem ersten Milliliter vereinigt. Diese zwei Milliliter Homogenat wurden nach entsprechender Vorverdünnung im Radioimmunoassay verwendet.

2.7. RADIOIMMUNOASSAY

2.7.1 THEORIE (allgemein)

Die Methode geht auf BERSON und YALOW zurück. Ihr liegt die Antigen - Antikörper - Bindung zugrunde. Man macht sich dabei zunutze, daß der Antikörper nicht zwischen unmarkietem und radioaktiv markiertem Antigen (in diesem Assay: Hormon) unterscheidet. Entsprechend der Menge an "kaltem", das ist unmarkiertes, Hormon wird das zuvor gebundene "heiße" Hormon aus der Bindung mit dem Antikörper gedrängt. Benutzt man bekannte verschiedene Mengen an "kaltem" Hormon so kann man eine Standardkurve graphisch konstruieren mittels welcher die zu bestimmenden Hormonmengen gefunden werden. (Siehe Teil 2.7.5).

2.7.2 BESCHREIBUNG (speziell)

Serum und Hypophysen LH und FSH wurden mittels Radioimmunoassaymethode bestimmt, im wesentlichen den Vorschriften des rat pituitary distribution program des NIAMDD folgend. Der zweite Antikörper war Anti - rabbit - gamma - globulin der Wellcome Laboratories (England). Gereinigtes LH (NIAMDD - rat - LH-I-3) und FSH (NIAMDD - rat-FSH-I-1) wurde mittels der Chloramin-T-Methode iodiniert. LH-Werte sind als NIAMDD - rat-LH-RP-1 und FSH-Werte als NIAMDD-rat-FSH-RP-1 angegeben. Für Serumwerte als ng/ml, für Hypophysenwerte als ng/mg frisches Gewebe.

Die Schritte im Einzelnen

1. Die Assayröhrchen bestanden aus Wegwerf-Plastik-Reagenzröhrchen.

2. In diese Röhrchen wurde Diluent zugegeben (Gesamtreaktionsvolumen von 800 µl)

3. Weiterhin wurde das zu untersuchende Serum oder die Standardverdünnung der Reference Präparation von 500 ng bis 2,5 ng in solchen Zwischenstufen zugegeben, daß eine Standardkurve gezeichnet werden konnte.

4. In einer Arbeitsverdünnung von 1: 10 000 bis 1: 15 000 (in mit 3% normalem Rabbit-Serum versetztem Phosphatpuffer) wurden 200 µl des Antiserums gegen das jeweilig zu messende Hormon gegeben.

5. Das Gemisch wurde auf einem Rotator kurz aufgeschüttelt und 24 h bei 4°C inkubiert.

6. Folgend wurden 100 µl jodiertes Hormon in einer Verdünnung von 40x 10^3 counts pro 200 Sek. dazugegeben.

7. s. Schritt 5

8. Nach dieser Zeit wurden 200 µl genügend (meist 1: 12) verdünntes Anti-Rabbit-Gamma-Globulin dazugegeben um die maximale Präzipitation des an den Antikörper gebundenen Hormons zu erreichen. Verdünnung mit 0,01 molarem Phophatpuffer.

9. Nach kurzem Schütteln des Gemisches wurde 3 Tage bei 4 Grad Celsius inkubiert.

10. Zentrifugation (2000X g für 2 Stunden), der Überstand wird abgekippt. Das Präzipitat in einem Packard Gammazähler gezählt.
(Typ Packard Auto Gamma Scintillation Spectrometer Nr. 5160).

2.7.3 JODIERUNG

Die Jodierung des Hormons erfolgte in folgender chronologischen Reihenfolge nach der Chloramin-T-Methode (GREENWOOD, HUNTER und GLOVER).
Ein Gemisch aus 2 µg des Hormons
+ 20 µl des 0,5 M Phophatpuffers
+ 0,5 mCi J^{125} 5ul Lösung
+ 10 µl Chloramin T (125 mg in 50 ml 0,01 M Phosphatpuffer gelöst)

wurde innerhalb einer Reaktionszeit von einer Minute auf einem Rotamixer (Fa. HOCK + TUCKER) gemischt. Dazu wurden

+ 30 µl Natriumpyrosulfit (125 mg in 50 ml 0,01 M Phophatpuffer gelöst)
+ 100 µl Transferlösung

gegeben. Dieses Reaktionsgemisch wurde auf die Sephadexsäule (G-75- Füllung ca. 10 cm lang, 1 cm Durchmesser) gebracht.
Das Reaktionsgefäß selbst wurde danach zweimal mit 2o µl 2% BSA-Lösung ausgespült und diese ebenfalls auf die Säule gegeben.
Als nächster Schritt erfolgte die Eluierung der Sephadexsäule mit 0,01 M Phosphatpuffer, in Fraktionen von 1 ml (Vorlage: 0,5 ml 2% BSA-Lösung). Die daraus erstellte Elutionskurve war repräsentativ für die Radioaktivität der einzelnen Fraktionen.
(siehe Abb. 1)

2.7.4. SÄULENHERSTELLUNG

1. In destilliertem Wasser oder in 0,01 M Phosphatpuffer kocht man 5-6 Gramm Sephadex eine Stunde lang auf und lasse es erkalten. Den gleichen Effekt erhalte ich jedoch durch Aufquellen über Nacht.

2. Die Säule wird in entsprechender Höhe gefüllt.

3. Mit 0,01 M Phosphatpuffer wird sie 2-3 mal eluiert und folgend mit 2% Rinderserumalbumin in Phosphatpufferlösung äquilibriert.

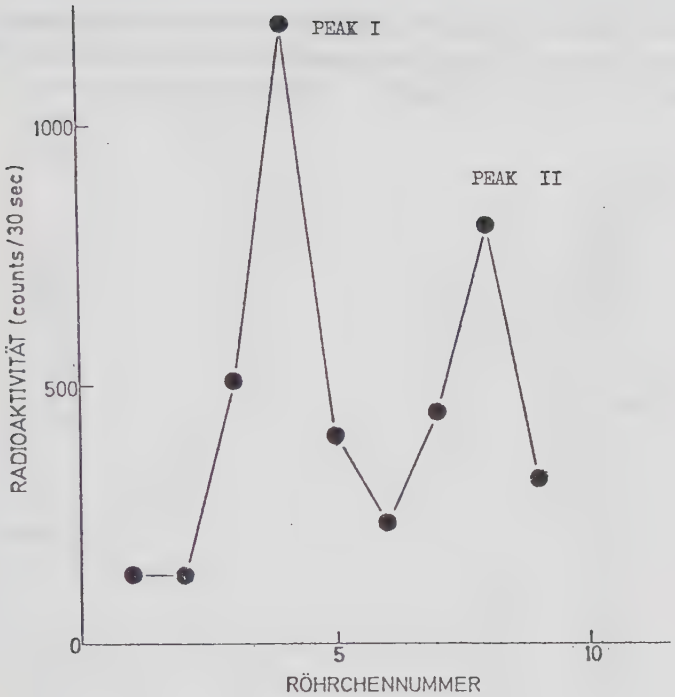

Abb. 1:
Die Elutionskurve zeigt zwei Peaks, wobei Peak I dem Immunreaktiven jodierten Hormon entspricht. Peak II stellt den Salzpeak, Hormonbruchstücke, Verunreinigungen sowie frei es radioaktives Jod dar.

2.7.5 STANDARDKURVEN

Die Standardkurve stellt B/T in % zur Hormonmenge dar. Unter Bound (B) versteht man den Prozentsatz der durch den Antikörper gebundenen Ausgangsradioaktivität (T).

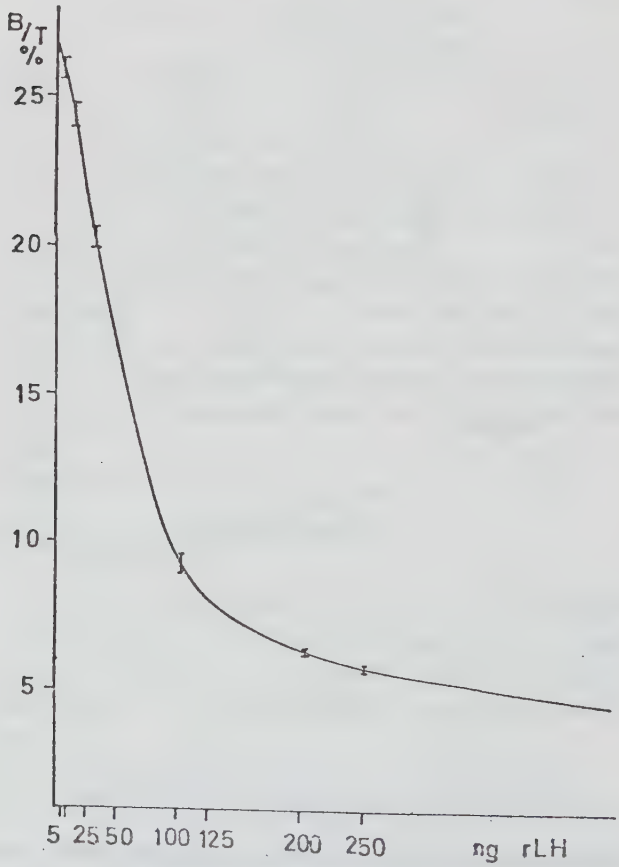

Abb. 2:

Standardkurve für LH

Diese Kurve setzt die Counts zur Hormonmenge in Relation, wobei die Counts den gebundenen Teil der Radioaktivität der Gesamtradioaktivität, die gemessen wird, dargestellt.

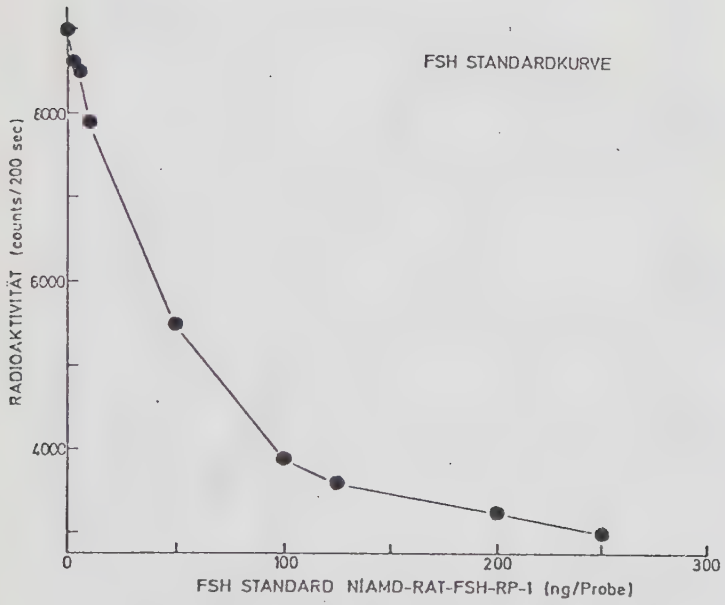

Abb. 3:

Standardkurve für FSH

Hier wird durch die Standardkurve B/T in % zur logarithmischen Darstellung der Hormonmenge aufgezeichnet.

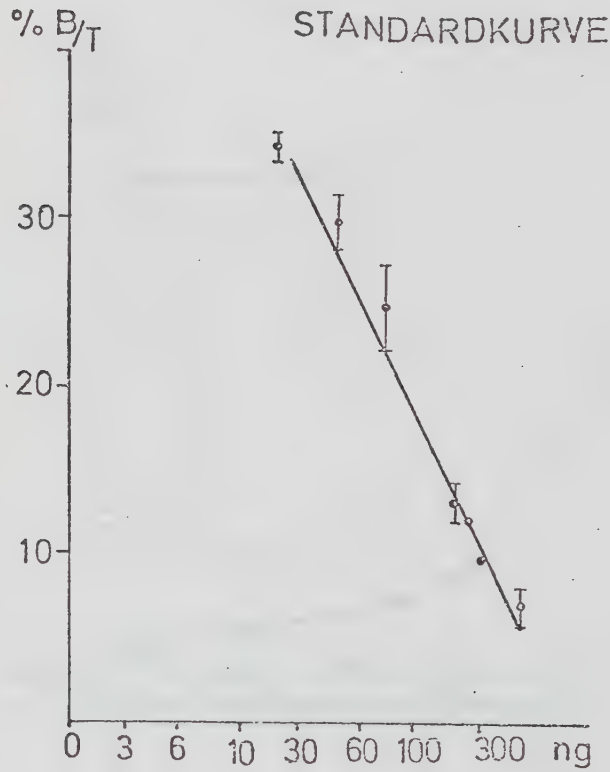

Abb. 4:

Standardkurve

Die Abbildung zeigt eine weitere Form der Darstellung der Standardkurve: B/B_o gegen logit y ist hier für rLH gezeichnet. Die Standardkurve erhält dadurch die Form einer Geraden. B steht hier für die Counts, die trotz der Gegenwart des wetteifernden unmarkierten Hormons gebunden wurden.

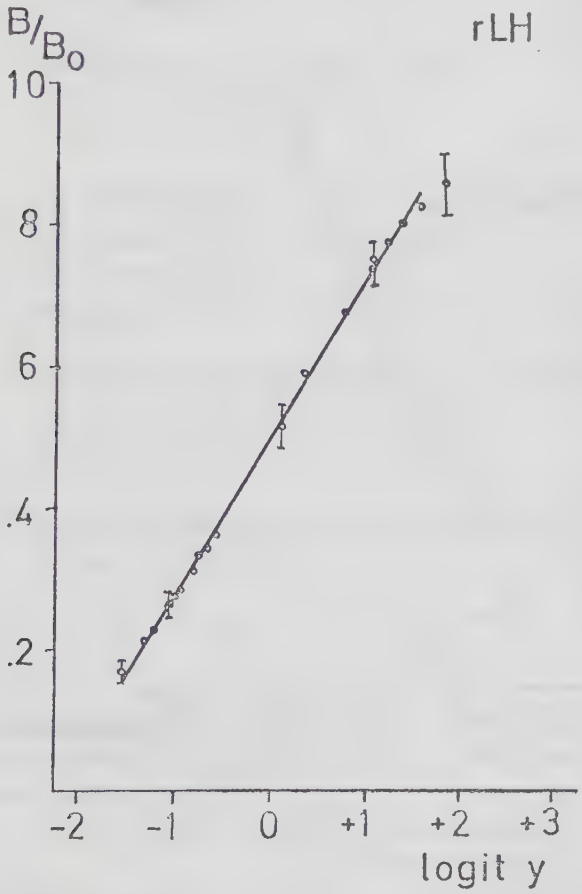

Abb. 5:

Diese Kurve sagt das Gleiche aus nur für rFSH

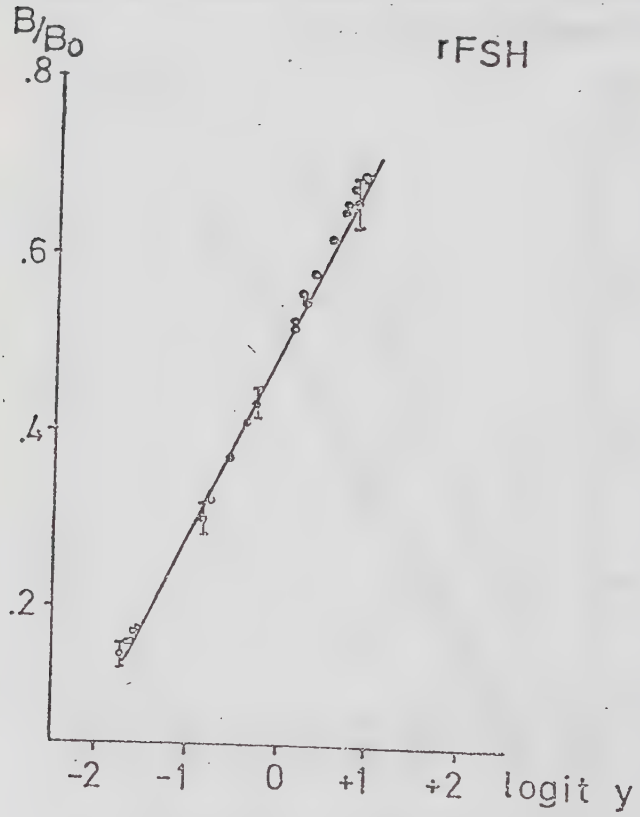

Abb. 6:

2.7.6 JODIERUNGSBERECHNUNGEN

Mit ihr kann sowohl die radioaktive Bindung als auch die spezifische Aktivität pro Hormon bestimmt werden.

1. Summe der Proteincounts = Prot.
(a bis b) minus (b bis a) x Background
prot. = $_{a-b}$Protein - (b-a) bg

2. Summe der Salzcounts = Salz
(c bis d) minus (d bis c) x bg
Salz = $_{c-d}$Salz - (d-c) bg

3. Startmaterialcounts minus Background = $SM_{korr.}$
auf Volumen von 84.6% korrigiert
(s.Geometrietest)
$SM_{korr.}$ = (SM - bg) x 0,846

4. Gefäß- und Pipette-Counts minus Background = $G/P_{korr.}$
auf Volumen von 84,6% korrigiert
$G/P_{korr.}$ = (G/P - bg) x 0,846

5. Startmaterial korrigiert minus Salz = Gesamtprotein:
$Ges._{prot.}$ = $SM_{korr.}$ - Salz

I. Ausbeute = yield (in %) = $100 - \frac{100 \text{ x Salz}}{SM_{korr.}}$

II. Spezifische Aktivität = spez. Akt. (in µCi/µg)
eingesetzte Aktivität (einges. Akt.; in der Regel 0,5 µCi)
eingesetzte Menge Hormon (einges. Hormon; in der Regel 2 µg)

$$\text{spez. Akt.} = \frac{\text{yield x einges. Akt.}}{100 \text{ x einges. Hormon}}$$

III. Wiederfindung Hormon = Rec. Hor. (in %) = $\frac{(G/Pkorr.+pro.)x10($
$Ges._{prot.}$

IV. Wiederfindung Radioaktivität = Rec. Rad. (in%)

$$\text{Rec. Rad.} = \frac{(\text{prot.} + \text{salz}) \times 100}{SM_{korr.} - G/P_{korr.}}$$

Die Ausbeute betrug zw. 54 und 84 %
Die spezif. Aktivität zw. 120 und 180 µCi/µg des Hormons
Die Wiederfindung des Hormons zw. 85 - 98 %
Die Wiederfindung der Radioaktivität zw. 81 - 91 %

2.7.7 TESTUNGEN

2.7.7.1 GEOMETRIETEST

Bei der Berechnung der spezifischen Aktivität muß berücksichtigt werden, daß durch die Messungsart (kristallmessung) die volle Aktivität nicht erfaßt wird. Die Messung erfolgt durch einen Kristall unterhalb einer Bohrung, durch die der gemessene Raum begrenzt wird.
Eine Verdünnung der Ausgangsradioaktivitat auf ein Volumen von 15 ml erfaßt nur 84,6% der Radioaktivität. Dieses Kalkül mußte in die Berechnung eingebracht werden.

2.7.7.2 TESTUNG DER B_0 - BINDUNG

Die Maßnahme, denen das Hormon bisher unterzogen wurde, machen eine Prüfung auf die noch bestehende immunologische Funktionsfähigkeit notwendig.
B_0 - Bindung ist konzentrationsgemäß. Sie wird in der nichtkompetitiven Phase gemessen.

2.7.7.3 Bindungstest für 1. und 2. Antikörper

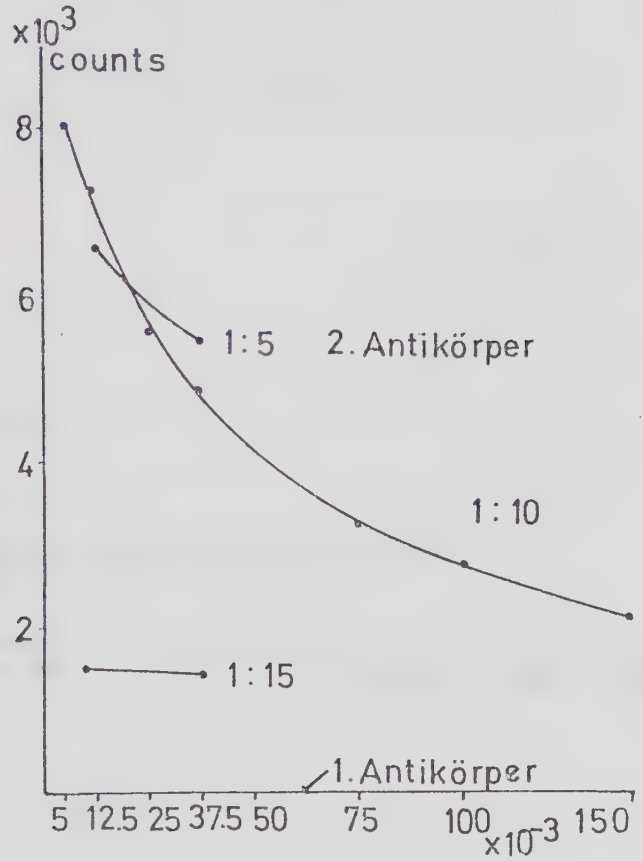

Abb. 7:
Der Bindungstest zeigt wieviel Counts bei den verschiedenen Antikörperverdünnungen gebunden werden.

2.7.7.4 Test auf Verlässlichkeit des Radioimmunoassay

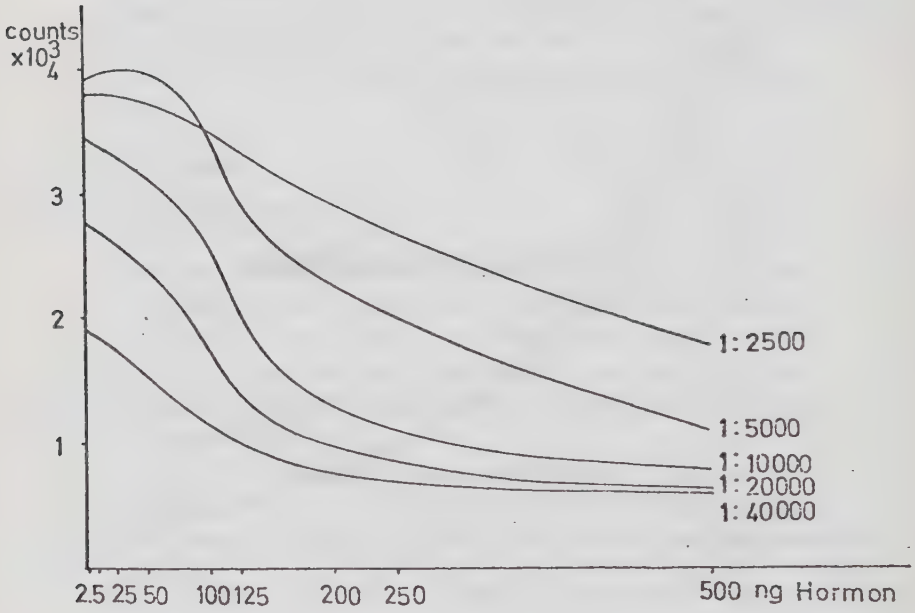

Abb. 8:
Der Test ergibt eine optimale Konzentration des 1. Antikörpers bei einer Verdünnung von 1: 10 000. Der flache Kurvenverlauf der übrigen Kurven kennzeichnet eine weniger optimale Verdünnung.

2.7.8 INTER- UND INTRAASSAY-VARIATION

Die Abweichung eines Serums gleicher Hormonkonzentration in unterschiedlichen Assays(durchschn. 10 -15 %) ist die Interassay-Variation, während die Intraassay Abweichung (durchschn. 5-10%) durch mehrfache Bestimmung im gleichen Assay zustandekommt.

3. ERGEBNISSE

3.1 SERUM LH DER KONTROLL- UND VERSUCHSTIERE

Bis zum pubertären Alter der Ratte bewegen sich die Spiegel der Versuchstiere im Bereich derer der Kontrolle. Am 33. Lebenstag (siehe Abb. 9) erfolgt ein steiler signifikanter Anstieg, welcher bis zum 40. Lebenstag wieder auf Normalniveau absinkt am 40. und 50. Lebenstag dagegen jedoch wieder signifikant höher liegt. Bei den 76 Tage alten Ratten kehrt sich dieses Bild um und die LH-Werte liegen signifikant unterhalb den angestiegenen Normalwerten.

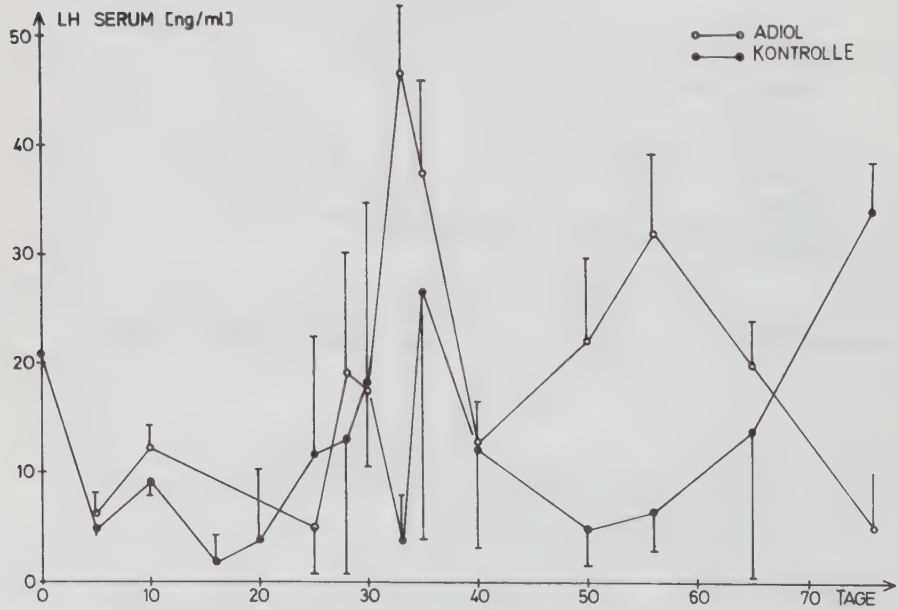

Abb. 9:
Zeigt die LH Ergebnisse im Serum für die Kontrolltiere und die Androstandiol behandelten Tiere.

3.2 SERUM FSH DER KONTROLL- UND VERSUCHSTIERE

Bei den präpubertären Tieren findet sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Kontrolltieren und den Androstandiol behandelten Ratten (siehe Abb. 1o). Vom 25. Lebenstag an zeigt sich jedoch eine starke, signifikante Steigerung des FSH-Spiegels gegenüber dem der Kontrolle. Diese Erhöhung setzt sich bis zum 65. Lebenstag fort, sieht man von den 56. Tage alten Tieren einmal ab. Die sicher erwachsenen 76 Tage alten Tiere unterscheiden sich im FSH-Serumgehalt nicht mehr.

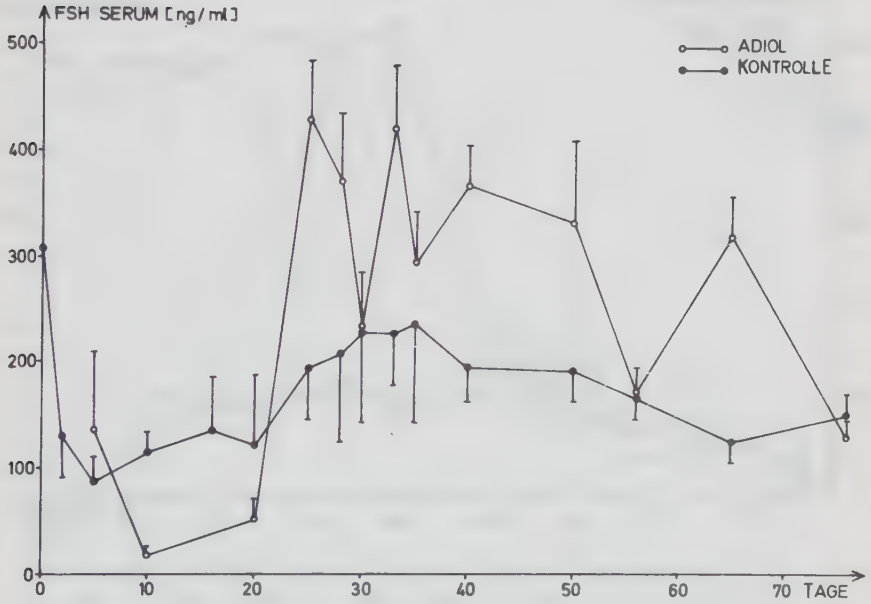

Abb. 10:
FSH-Gehalt im Serum von Kontrollgruppe und Androstandiol behandelten Tieren.

3.3 HYPOPHYSEN LH DER KONTROLL- UND VERSUCHSTIERE

Vom 5. bis 40. Lebenstag bewegen sich die Hypophysen-LH-Werte der behandelten Tiere im Bereich der Kontrollwerte (siehe Abb. 11). Ab dem 5o. Lebenstag erfahren diese eine Steigerung von über 300% des Kontrollwertes und bleiben auf diesem hohen, signifikant unterschiedlichem Niveau bis zu Tag 76.

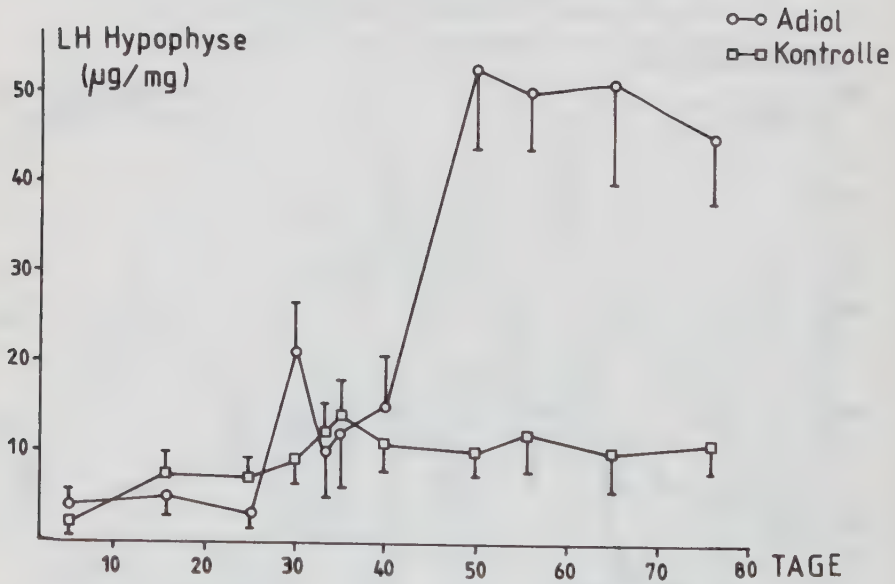

Abb. 11:
Gibt die Ergebnisse für das hypophysäre LH wieder.

3.4 HYPOPHYSEN FSH DER KONTROLL- UND VERSUCHSTIERE

Auch hier zeigen sich, wie beim hypophysären LH, bis zum Alter von 40 Tagen keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe (siehe Abb. 12). Dann kommt es zum signifikanten Anstieg ab dem 50. Lebenstag um ca. 100% des Kontrollwertes. Dieser signifikante Unterschied bleibt konstant bis zur ältesten Altersgruppe, den 76 Tage alten Ratten. Beide Gruppen, Kontrolle und Androstandiolbenandlung, zeigen eine gleichartige abfallende Tendenz mit dem Alter beginnend mit dem 5o. Lebenstag.

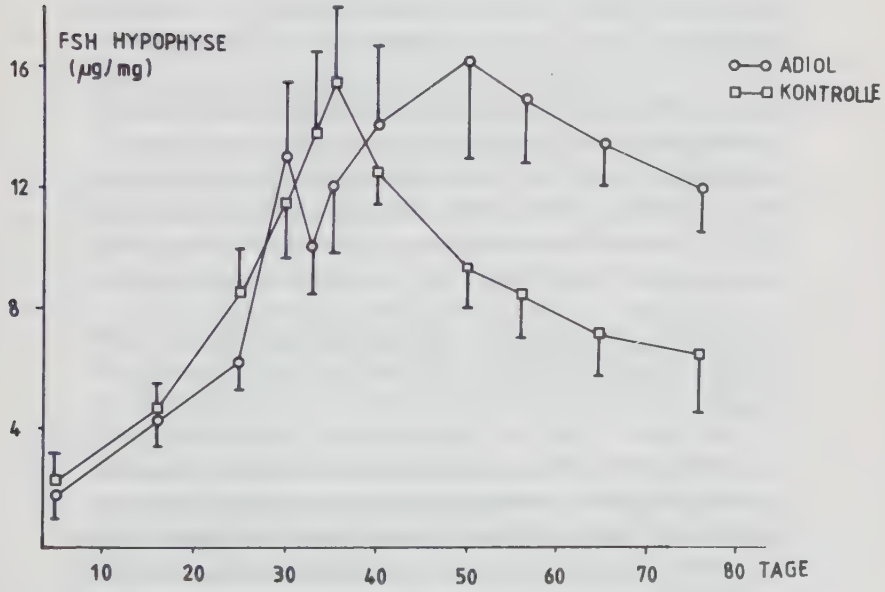

Abb. 12: Ergebnisse für hypophysäres FSH.

4. DISKUSSION

Androstandiol ist wie DHT ein 5 α - reduzierter Metabolit des wichtigsten Androgens der Gonaden, des Testosterons. Es kann sowohl von den Keimdrüsen selbst, als auch von der Hypophyse durch das Enzym 5-α-Reductase gebildet werden.(STERN, et al.1971; MASSA, et al.1972; DENEF,et al.1973; DENEF,et al.1974; KLEMM,et al. 1976; GUPTA, D. 1978)

Es ist bekannt, daß die 5 α - reduzierten Metabolite eine starke Feedbackwirkung auf die Serumspiegel insbesondere des LH haben. Ähnlich oder stärker der des Testosterons. (ZANISI, et al.1973; SWERDLOFF, et al. 1973; VERJANS et al., 1975)

Der Aspekt einer chronischen Gabe des Androstandiols, über alle Entwicklungsstufen hinweg, von der Geburt bis zur vollen geschlechtlichen Reife, ist eine kaum bekannte Größe in dem schon bekannten Bild. Sie ist deshalb von Interesse, weil vorangegangene Experimente im Labor von Prof. GUPTA einen hohen Korrelationskoeffizienten der 5 α - reduzierten Metabolite und der Gonadotropine gefunden wurden (KLEMM et al., 1976; GUPTA et al., 1978).

Die LH - Werte im Serum und in der Hypophyse sind bis zum Beginn der Pubertät nicht signifikant von denen der Kontrolltiere verschieden. Im Serum zeigt sich aber dann ab Tag 33 ein hochsignifikanter ($P < 0,01$) Anstieg, welchen in den Hypophysenergebnissen ein unterbrochener Anstieg gegenüberstent (siehe Abb. 9 und Abb. 11). Dies könnte bedeuten, daß mit

dem Erreichen der Pubertät eine starke Stimulation der Freisetzung von LH aus der Hypophyse einsetzt. Die höheren LH-Werte im Serum gegenüber den im Rahmen der Kontrolle sich bewegenden Hypophysenwerten müßte als eine durch Androstandiol hervorgerufene verstärkte Synthese gedeutet werden. Diese vermehrte Synthese kommt noch deutlicher zum Ausdruck bei den postpubertären Altersstufen, bei welchen zu den hohen Serumwerten hochsignifikante Hypophysenwerte ($p < 0,01$) zu finden sind. Den niederen LH-Werten der Androstandiolgruppe bei den 76 Tage alten Ratten, stehen dagegen hohe LH-Werte der Kontrolltiere gegenüber, ohne daß dies in den Hypophysären Werten eine Entsprechung findet. Insgesamt betrachtet zeigt sich demnach kein Einfluß des Androstandiols auf präpubertäre Ratten. Ein erster Unterschied jedoch bei den pubertären Tieren indem eine verstärkte Freisetzung aus der Hypophyse auftritt, welche gefolgt wird von einer vermehrten Synthese. Und erst die vollerwachsenen Tiere zeigen eine Hemmung der LH-Konzentration, wie es eigentlich von einer androgenen Substanz zu erwarten gewesen wäre.

Die FSH - Ergebnisse zeigen zunächst bei den präpubertären Tieren eine Hemmung der Werte im Serum durch Androstandiol, welche jedoch ab dem 25. Lebenstag in eine signifikante ($p < 0,01$) Erhöhung übergeht, welches von einem leichten zurückbleiben des Hypophysenwertes begleitet wird. Der signifikanten Erhöhung der Serum FSH-Werte zur Zeit der Pubertät entspricht ein Abfall des FSH-Gehaltes in der Hypophyse. Die FSH-Werte der Hypophyse zeigen eine Verschiebung im Vergleich zu den Kontrollwerten (siehe Abb. 12). Sie erreichen das pu-

bertäre Peakniveau am Tag 5o und zeigen danach einen paralellen Abfall zu dem des Normalbildes. Im Serum zeigt sich eine Erhöhung von 50-80 % des Kontrollwertes, bis dann bei den vollerwachsenen Tieren ein Abfallen auf den Kontrollwert im Serum auftritt.

Insgesamt ergibt sich demnach, daß Androstandiol bei den prapubertären Tieren eine Hemmung der FSH-Konzentration zu bewirken scheint, welche bei Tag 25, also dem Übergang zur Pubertät in einen "verfrühten" Peak umschlägt, den geringeren Gehalt der Hypophyse an FSH zu diesem Zeitpunkt könnte man als eine verstärkte Freisetzung deuten. Anschließend scheint es zusatzlich zu einer vermehrten Synthese zu kommen, da Serum wie Hypophysenwerte über denen der Kontrollgruppe liegen. Bei den vollerwachsenen Ratten ist die Serummenge wieder auf Kontrollniveau abgesunken, der Hypophysengehalt jedoch noch weit oberhalb des Normalen gelegen, wie dies ja auch bei LH der Fall war.

LH und FSH zusammen betrachtet kann gesagt werden, daß eine unterschiedliche Wirkung des Androstandiols auf LH und FSH zu verzeichnen ist. Im präpubertären Alter zeigt sich auf LH so gut wie keine Wirkung, auf FSH dagegen eine Hemmung. In der Pubertät kommt es bei beiden Gonadotropinen zu einem Anstieg der Hypophysengehalte über die Werte der Kontrolle und anschließend zu einem erhöhten Peak im Serum, wobei für FSH dieser Peak schon am 25. Lebenstag zu finden ist. Im nachpubertären Alter sind bei beiden Hormonen die Hypophysenwerte stark erhöht, welches auch im Serum zu einer Erhöhung führt, diese positive Wirkung ist

für LH stärker wirksam. Ein Unterschied tritt dann jedoch wieder auf bei den erwachsenen Tieren, dadurch, daß die Androstandiol behandelten Ratten für LH eine Hemmwirkung zeigen, für FSH dagegen dies nicht der Fall ist.

Abschließend ist festzustellen, daß diese interessanten Ergebnisse um ein besseres Verständnis des gesamten Vorganges der geschlechtlichen Reifung zu ergeben im Zusammenhang mit den anderen 5α- reduzierten Metaboliten gesehen werden müßten, sowie in Beziehung zu setzen sind mit dem Testosteron. Ein Trend scheint jedoch deutlich, daß nämlich das Androstandiol in einer Weise am Zustandekommen der Gonadotropinkonzentrationen beteiligt ist, welche für verschiedene Alterstufen verschieden sein dürfte und daß ein Unterschied der Wirkung auf LH und FSH zu existieren scheint.

Die Aufklärung der genauen Rolle bedarf noch weiterer Experimente.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Männliche Ratten wurden von Geburt bis zum Erwachsenenalter mit 4 µg/100g Körpergewicht Androstandiol injiziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten über die gesamte Geschlechtsentwicklung verteilt wurden Blutproben und Hypophysengewebe entnommen und die LH - und FSH-Konzentrationen bestimmt.

Es ergab sich, daß Androstandiol eine Wirkung auf beide Gonadotropine ausübt, welche für die einzelnen Hormone und die verschiedenen Altersstufen unterschiedlich ausfällt.

Die Wirkung auf LH ist stärker positiv ab dem pubertären Alter. Davor wirkt Androstandiol nur auf FSH negativ ein. Im späteren Alter dagegen wird nur LH negativ beeinflußt. Während der Release beider Hormone in der Pubertät erhöht ist, finden sich nach der Pubertät in der Hypophyse signifikant erhöhte Gonadotropinkonzentrationen, welche, da auch die Serummengen erhöht sind, auf eine erhöhte Synthese schließen lassen.

6. LITERATUR

DENEF, C., MAGNUS, C., and McEWEN, B.S.
Sex-dependent changes in pituitary 5-alpha-dihydrotestosterone and 3-alpha-androstanediol formation during postnatal development and puberty in the rat.
Endocrinology 94, 1265-1274 (1974).

DENEF, C., MAGNUS, C., and McEWEN, B.S.
Sex differences and hormonal control of testosterone metabolism in the rat pituitary and brain.
J. Endocrinol. 59, 605-621 (1973).

DONOVAN, B.T., and VAN DER WERFF TEN BOSCH, J.J.
Precocious puberty in rats with hypothalamic lesions.
Nature 178, 745 (1956).

EICHNER, M.
Hypothalamische-hypophysäre-gonadale-Achse und deren Veränderung im Verlauf der Pubertät in männlichen Ratten.
Diplomarbeit für Biologie beim Fachbereich Biologie der Universität Tübingen (1975).

GREENWOOD, F.C., HUNTER, W.M., and GLOVER, J.S.
The preparation of J^{131} labelled human growth hormone of high specific radioactivity.
Biochemical Journal 89, 114-123 (1963).

GUPTA, D.
Gonadal steroids and gonadotrophin feedback regulation of mammalian sexual maturation.
In: Recent progress in reproductive endocrinology, pp. 543-564. Eds. P.G. Crosignani and V.H.T. James, London, Academic Press (1974).

GUPTA, D.
Hypothalamic control of the mammalian sexual maturation.
In: Aktuelle Probleme der pädiatrischen Endokrinologie,
pp. 83-102.
Springer-Verlag, Wien-New York (1977).

GUPTA, D.
Hormonal control of the pubertal development.
In: Auxology:Human growth in health and disorder,
pp. 87-100. Eds. L. Gedda and P. Parisi, Academic Press,
London (1978).

GUPTA,D.,KLEMM,W.,and EICHNER,M.
Augmentation of in vitro pituitary biotransformation of
testosterone due to orchidectomy and its relation to
serum gonadotropins in the rat.
Res. exp. Med. 172, 239-246 (1978).

HARRIS, G.W. and JACOBSOHN, D.
Functional grafts of the anterior pituitary gland.
Proc. Roy. Soc. B 139, 263-276 (1952).

HOHLWEG, W. and JUNKMANN, K.
Die hormonal-nervöse Regulierung der Funktion des
Hypophysenvorderlappens.
Klin. Wochenschrift 11, 321-323 (1932).

KINGSLEY, T.R. and BOGDANOVE, E.M.
Direct feedback of androgens: Localized effects of
intrapituitary implants of androgens on gonadotropic
cells and hormone stores.
Endocrinology 93, 1398-1409 (1973).

KLEMM, W., EICHNER, M., and GUPTA, D.
Relation between rat pituitary metabolism of testosterone and plasma LH and FSH.
In: The laboratory animal in the study of reproduction. Eds. Th. Antikatzides, S. Erichsen and A. Spiegel, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart-New York (1976).

MASSA, R., STUPNICKA, E., KNIEWALD, Z., and MARTINI, L.
The transformation of testosterone into DHT by the brain and the anterior pituitary.
J. Steroid Biochem. 3, 385-399 (1972).

SCHALLY, A.V., ARIMURA, A., BABA, Y., NAIR, R.M.G., MATSUO, H., REDDING, T.W., DEBELJUK, L., and WHITE, W.F.
Isolation and Properties of the FSH-and LH-releasing hormone.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 43, 393-399 (1971).

SCHALLY, A.V., NAIR, R.M.G., REDDING, T.W., and ARIMURA, A.
Isolation of the luteinizing hormone and follicle stimulating hormone-releasing hormone from porcine hypothalami.
J. Biol. Chem. 246, 7230-7236 (1971).

STERN, J.M. and EISENFELD, A.J.
Distribution and Metabolism of ^{3}H-testosterone in Castrated Male Rats; Effects of Cyproterone, Progesterone and Unlabelled Testosterone.
Endocrinology 88, 1117-1125 (1971).

SWERDLOFF, R.S., GROVER, P.K., JACOBS, H.S., and BAIN, J.
Search for a substance which selectively inhibits FSH-effects of steroids and prostaglandins on serum FSH and LH levels.
Steroids 21, 703-722 (1973).

VERJANS, H.L., VAN DER MOLEN, H.J., and EIK-NES, K.B.
Relation between circulating levels of testosterone, LH and FSH in intact and castrated, adult, male rats after testosterone administration.
Acta Endocr. (Kbh.) 79, 380-386 (1975).

ZANISI, M., MOTTA, M., and MARTINI, L.
Inhibitory effect of 5-alpha-reduced metabolites of testosterone on gonadotropin secretion.
J. Endocr. 56, 315-316 (1973).

ZONDEK, B.
Über die Funktion des Ovariums.
Z. Geburtsh. Gynäk. 90, 372-380 (1926).

7. ANHANG

Herrn Professor Dr.Derek Gupta,dem Leiter der Abteilung für endokrinologische Laboratoriumsdiagnostik, möchte ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, sowie für die immer gern gewährte Hilfe und Geduld bei der Fertigstellung dieser Arbeit herzlich danken.

Herrn Diplom Biologen,cand.med. Manfred Eichner möchte ich für die Hilfe bei der Einarbeitung in das Experiment, sowie die Methodik der radioimmunologischen Gonadotropinbestimmung danken.

Lebenslauf

Am 23.12.1947 wurde ich, Heinrich Hermreck, als Sohn des Franz Hermreck und seiner Ehefrau Bernhardine geb. Weidekemper in Neuenkirchen im Kreis Gütersloh geboren. Von 1954 bis 1960 besuchte ich die Volksschule in Gütersloh, von 1960 bis 1962 das gymnasiale Internat der Jesuiten in Bad Driburg, wechselte jedoch aufgrund familiärer Schwierigkeiten über auf die Realschule Gütersloh, wo ich 1966 die Mittlere Reife bestand. Von 1966 bis 1968 folgte die Höhere Wirtschaftsschule mit Abschluß. Anschließend absolvierte ich eine Industrielehre bei der Fa. Munkel in Bornholte mit der Abschlußprüfung gut. Im letzten Lehrjahr 1969 besuchte ich das Abendgymnasium in Bielefeld. 1970 bestand ich nach nur einjähriger Vorbereitungszeit das Externenabitur im mathematisch-naturwissenschaftlichen Zweig mit großem Latinum. Die kurze Vorbereitungszeit bedingten Zensuren, die mich zwei Jahre auf einen Studienplatz in Medizin warten ließen. In der Zwischenzeit machte ich ein Studium generale und leistete in den Semesterferien Krankenpflegedienst.

1972 begann ich in Marburg das Studium der Humanmedizin. 1974 machte ich Physikum, dann folgten 1975 das 1. Staatsexamen in Tübingen, das 2. Staatsexamen 1977 und das 3. Staatsexamen am 30.5.1980 ebenfalls in Tübingen.

Meine Doktorarbeit schrieb ich auf dem Gebiet der Endokrinologie unter Professor Dr. med. Jürgen Bierich und Professor Dr. rer.nat. Derek Gupta, Biochemiker in der Kinderklinik Tübingen.

Seit 1972 bin ich verheiratet; meine Frau ist Sonderschullehrerin im hessischen Schuldienst. Wir haben eine fünfjährige Tochter und einen dreijährigen Sohn.